Aus der I. Medizinischen Abteilung
des Städtischen Auguste-Viktoria-Krankenhauses Berlin-Schöneberg
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. K. H. Pfeffer

VERÄNDERUNGEN DER KONZENTRATION IM PLASMA VORHANDENER SCHILDDRÜSENHORMONE UND JODIERTER AROMATISCHER AMINOSÄUREN NACH DER APPLIKATION VON THYREOTROPIN BEIM MENSCHEN

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Fred Rainer Prange
aus Treuburg (Ostpreußen)

1970

Aus der I. Medizinischen Abteilung des Städtischen Auguste-Viktoria-Krankenhauses Berlin-Schöneberg

Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. K. H. P f e f f e r

Veränderungen der Konzentration im Plasma vorhandener Schilddrüsenhormone und jodierter aromatischer Aminosäuren nach der Applikation von Thyreotropin beim Menschen.

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Fred Rainer Prange
aus
Treuburg (Ostpreußen)

Dekan: Prof. Dr. H. L A X

Referent: Prof. Dr. K. H. P F E F F E R

Korreferent: Prof. Dr. H. K E W I T Z

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin.

Promoviert am: 15. 1. 1970

UNIV. LEIDEN BIBL.

VERÄNDERUNGEN DER KONZENTRATION IM PLASMA VORHANDENER SCHILDDRÜSENHORMONE UND JODIERTER AROMATISCHER AMINOSÄUREN NACH DER APPLIKATION VON THYREOTROPIN BEIM MENSCHEN.

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

EINLEITUNG..... 1

MATERIAL UND METHODE..... 3

Probanden..... 3

Thyreostimulation..... 3

Serumextraktion und Reinigung des Extraktes..... 7

Dünnschichtchromatographie..... 7

Farbreagenz..... 9

ERGEBNISSE..... 11

Vorversuche..... 11

Hauptversuche..... 14

Ergebnisse des Ausgangsspektrums..... 14

Veränderungen des Spektrums nach Gabe von Thyreotropin..... 14

DISKUSSION..... 19

ZUSAMMENFASSUNG..... 23

LITERATUR..... 24

E I N L E I T U N G

Die Wirkungen von Thyreotropin auf lebende Organismen können an Hand verschiedener Parameter bewertet werden. Den ersten klinischen Methoden mit Untersuchungen über Pulsfrequenz und grobe Veränderungen der äußeren Form der Schilddrüse, folgten Laboruntersuchungen, wie Grundumsatz- und Cholesterinbestimmung. Es schlossen sich Methoden mit Versuchstieren an, von denen die Untersuchung über die Beschleunigung der Kaulquappenmetamorphose durch Thyreotropin ein klassisches Beispiel ist (1-3).

Die Markierung der Schilddrüsenhormone durch Radiojod, bot schließlich die Möglichkeit genauere Bewertungen der Thyreotropinwirkung vorzunehmen, wobei nicht nur die Jodaufnahme und andere Zeichen der Aktivität des Schilddrüsenparenchyms, sondern auch die Ausschüttung von markierten Hormonen beobachtet werden konnte (4-5). Das Vorgehen mit markierten Hormonen weist trotz der zahlreichen wichtigen technischen Vorteile den Nachteil auf, daß eine gewisse Diskrepanz zu den chemischen Nachweismethoden besteht (6-9).

Tatsächlich bewiesen Werner und Block 1959 (10), daß, im Gegensatz zu der allgemeinen Annahme, im menschlichen Blut jodierte Tyrosine vorhanden sind. Die Behauptung war nicht nur sehr auffällig, weil sie im Gegensatz zu schon klassisch gewordenen Kenntnissen stand, sondern weil auch aus theoretischen Gründen die Anwesenheit von zirkulierenden Jodtyrosinen so gut wie ausgeschlossen schien (11-12). Trotzdem setzte sich die Ansicht von Werner und Block in den letzten Jahren durch, weil durch Anwendung von Methoden wie Neutronenaktivierung, die Möglichkeit des Vorliegens von Artefakten ausgeschlossen werden konnte (13-19).

Die chemischen Nachweismethoden der zirkulierenden Jodverbindungen erschweren sich dadurch, daß die interessierenden Substanzen im Serum nur in sehr geringen Mengen vorhanden sind. Man muß daher nicht nur über sehr empfindliche Nachweisreagentien, sondern auch über ausreichend effektive Extraktionsmetho-

den verfügen. Die durch solche Methoden gewonnenen Substanzen werden durch chromatographische Techniken weiter bearbeitet, um eine genaue Identifizierung der einzelnen Hormonfraktionen zu erzielen. Die Papierchromatographie bringt jedoch durch die langdauernden Trennungsverfahren, die sich gewöhnlich über 24 Stunden erstrecken, neue Fehlerquellen mit sich (20).

Daher bietet sich die Dünnschichtchromatographie, wegen der Schnelligkeit des Verfahrens, für die Trennung der zirkulierenden Jodaminosäuren geradezu an. Aus diesem Grunde wurde in diesem Labor schon vor einigen Jahren eine kombinierte Serumextraktion und dünnschichtchromatographische Trennung von Schilddrüsenhormonen und jodierten Derivaten entwickelt, die zur Klärung verschiedener Fragen der Schilddrüsenphysiopathologie angewandt wurde.

Mit dieser Methode werden nun in der vorliegenden Arbeit die Veränderungen, die durch Gabe von Thyreotropin im menschlichen Serum hervorgerufen werden, untersucht.

MATERIAL UND METHODE

Probanden

Die Untersuchungen wurden an 25 euthyreoten Probanden, die keine Kropfbildung zeigten, durchgeführt. Das Alter der Patienten lag zwischen 17 und 58 Jahren, bei einem Durchschnittsalter von 41 Jahren. 13 Probanden waren männlichen, 12 weiblichen Geschlechts (Tab.I). Als Kriterien für eine normale Schilddrüsenfunktion dienten ein Radiojodtest, eine PBI-Bestimmung und eine Bestimmung des Gesamtcholesterins. Bei dem Radiojodtest wurde die Jodspeicherung in der Schilddrüse 4 Stunden nach Gabe von 10 μC ^{132} J gemessen. Die Veraschung für die PBI-Bestimmung wurde in einem geschlossenen System bei saurem Milieu nach Klein durchgeführt. Das gebildete Jodid wurde durch Ceri-Sulfat bestimmt. (Normalwerte: 4,0 - 8,0 μg pro 100 ml Serum). Die Gesamtcholesterinbestimmung im Serum wurde nach Searcy und Bergquist durchgeführt. (Normalwerte: 150 - 260 mg in 100 ml Serum). Die Probanden hatten während der letzten Monate keine jodhaltigen und andere auf die Schilddrüse wirkenden Medikamente erhalten.

Die Patienten wurden zuerst zwecks Ausschließung einer Dysthyreose klinisch untersucht. Nach dieser Untersuchung wurde morgens nüchtern Blut zur Bestimmung des Ausgangsspektrums der zirkulierenden Jodverbindungen, sowie für PBI-, und Cholesterinbestimmung entnommen. Nach Bestätigung der Euthyreose durch den Radiojodtest wurde bei den Patienten eine dreitägige Stimulation der Schilddrüse durch Thyreotropin vorgenommen. Am 4. Tag wurde erneut Blut abgenommen, um die Änderungen im Spektrum der zirkulierenden Jodverbindungen festzustellen.

Thyreostimulation

Jedem Patienten wurden an drei aufeinanderfolgenden Tagen 10 USP-Einheiten Thyreotropin (Thyreostimulin, Organon) pro die intramuskulär injiziert. Die dadurch hervorgerufenen klinischen Symptome wurden tabellarisch dargestellt (Tab. VII).

T A B E L L E I

PROBAND.	GESCHLECHT	ALTER	EINWEISUNGSDIAGNOSE	PBI (γ%)	CHOLEST. (i
1	männlich	36	Asthma bronchiale	7,3	200
2	männlich	47	Absol. Arrythmie, lat. Diabetes	5,1	250
3	weiblich	42	Ischiasneuritis Spondyloarthrose	6,2	214
4	männlich	39	Diabetes mellitus zur Neueinstellung	7,4	242
5	männlich	32	Juveniler Hypertonus	6,3	152
6	weiblich	58	Vegetative Dystonie Ang. pectoris	5,4	268
7	weiblich	49	Paroxysm. Tachykard.	4,9	228
8	weiblich	54	Asthm. Emphysembronchitis	6,2	160
9	weiblich	56	Hypertonus	4,1	214
10	männlich	35	Angina pectoris	4,6	172
11	weiblich	54	Paroxysm. Tachykard.	7,3	266
12	weiblich	56	Fettleber	5,5	250
13	männlich	24	Vegetat. Dystonie	5,2	168

T A B E L L E I Fortsetzung

ROBAND.	GESCHLECHT	ALTER	EINWEISUNGSDIAGNOSE	PBI(γ%)	CHOLEST. (mg%
14	weiblich	52	Delir. Tremens	4,0	250
15	weiblich	47	Herzinsuffizienz, Cerebr.Durchblut-ungsstörung	5,3	214
16	männlich	35	Veget. Dystonie	6,2	200
17	weiblich	27	Veget. Dystonie	6,6	240
18	männlich	58	Diabetes mellitus	6,3	250
19	weiblich	29	Hypertonus, Verdacht auf Psychose	7,1	160
20	weiblich	17	Hyperventilations-tetanie	7,0	150
21	männlich	27	Ulcus ventriculi	8,0	140
22	männlich	57	Diabetes mellitus zur Neueinstellung	6,3	214
23	männlich	20	Fieberhafter grip-paler Infekt	7,1	146
24	männlich	31	Gastroduodenitis gravis	4,9	250
25	männlich	33	Verdacht auf Ulcus duodeni	6,1	146

NUMMER DER PROBANDEN	LOKALSYMPTOME: SPANNUNGSGEFÜHL SCHLUCKBESCHWERDEN LEICHTE KROPFBILD.	KARDIOVASCULÄRE SYMPTOME: TACHYKARDIE HERZKLOPFEN	SUBFEBRILE TEMP.
1	+		
2			
3			
4			
5	+		
6			
7			
8	+		
9	+	+	
10			
11	+		+
12	+		+
13	+		
14	+	+	
15			
16			
17			
18			
19	+		
20	+		
21	+		+
22	+		
23			
24			
25			

TABELLE VII: KLINISCHE SYMPTOMATIK BEI EINEM KOLLEKTIV VON 25 NORMAL PROBANDEN NACH GABE VON 30 USP-EINHEITEN THYREOTROPIN.

Serumextraktion und Reinigung des Extraktes

Für die Gewinnung der Jodaminosäuren aus dem Serum wurde eine bereits beschriebene Extraktion mit heissem Methanol (21-22) vorgenommen.

Es werden 5 ml Serum mit 0,5 ml 0,1 M Propylthiouracil versetzt, mit konzentrierter Essigsäure auf pH < 5 gebracht und mit 15 ml Methanol im Wasserbad am Rückflußkühler gekocht. Nach Zugabe einer Spatelspitze Aktivkohle wird 2 Minuten geschüttelt und 5 Minuten zentrifugiert. Die überstehende farblose Phase wird in ein 40 ml Zentrifugenglas mit Schliff gebracht. Der zurückgebliebene Niederschlag wird mit 5 ml Methanol durch Schütteln und Zentrifugieren reextrahiert. Der zweite Überstand wird mit dem ersten vereinigt und am Rotationsverdampfer bei Unterdruck und nicht über 60° bis zur Trockne eingeengt. Der Rückstand wird mit 10 ml 0,1 N Natronlauge gelöst (Kontrolle auf pH > 10 mit Indikatorpapier) und mit 10 ml Chloroform geschüttelt und zentrifugiert. Man saugt die unterstehende chloroformische Phase ab. Die wässrige Phase wird mit konzentrierter Salzsäure auf pH < 2 eingestellt. Durch Zugabe von 10 ml redestilliertem n-Butanol und Schütteln werden die Jodaminosäuren aus der wässrigen Phase gewonnen. Nach Zentrifugieren wird die wässrige Phase abgesaugt. Die butanolische Phase wird zweimal mit 5 bzw. 2,5 ml Wasser gewaschen und nach Entfernung der wässrigen Phase, im selben Röhrchen durch Verwendung eines Kapillaraufsatzes bei 60° zur Trockne eingeengt. Der trockene Extrakt wird mit 0,2 ml ammoniakalischen Methanols gelöst und auf die dünnschichtchromatographische Platte aufgetragen.

Dünnschichtchromatographie

Für die dünnschichtchromatographische Trennung der Jodaminosäuren erwiesen sich Systeme, die aus einer inaktiven Schicht und schwach saurem Fließmittel mit kleinen organischen Anteilen bestehen, als sehr geeignet (23-25). Es wurde versucht, die optimalen Bedingungen eines solchen Systems durch Vorversuche festzulegen.

Dabei wurde

a) die Anwendung von Cellulose mit und ohne

Zusatz von Gips,

b) die Länge der Laufstrecken und

c) der Einfluss der Temperatur

untersucht. Aus diesen Vorversuchen ergab sich folgendes System:

1) Aceton-0,5 N Essigsäure 2:8 (V:V), als Fließmittel
2) Cellulose G, als Schicht
3) Laufstrecke: 16 cm, in aufsteigender Richtung = ca. 1 1/2 Stunden Laufzeit
4) Temperatur: 20°.

Beschichtung der Platten:

Es wurden 20 x 20 cm Glasplatten benutzt, die mittels eines Desaga-Streichgerätes mit einer breiigen Suspension aus Cellulose mit Gipszusatz (MN 300 G, Firma Macherey, Nagel & Co, Düren) und Wasser beschichtet wurden. (20 g MN 300 G + 120 ml Wasser für 5 Platten). Das Streichgerät wurde auf 0,5 mm eingestellt. Die Platten wurden unter Warmluft getrocknet und auf Blau-Gel aufbewahrt.

Auf der selben Auftraglinie einer Platte wurden die Extrakte des Serums eines Probanden vor und nach Behandlung mit Thyreotropin (TSH), sowie je 40 µl zweier Standardmischungen getrennt aufgetragen.

Standardmischung I:

Je 0,1 mg von 3-Monojod-L-Tyrosin (MIT), 3,5-Dijod-L-Tyrosin (DIT), 3,5-Dijod-DL-Thyronin (T_2), 3,3',5-Trijod-DL-Thyronin (T_3) und 3,3',5,5'-Tetrajod-DL-Thyronin (T_4) wurden in 8 ml Methanol gelöst (also in 40 µl 0,5 µg von jeder Substanz).

Standardmischung II:

Je 0,1 mg von 3,5-Dijod-DL-Thyronin (T_2), 3,5-Dijod-L-Tyrosin (DIT), DL-Thyronin und L-Tyrosin wurden in 8 ml Methanol gelöst. (40 µl = 0,5 µg jeder Substanz).

Dünnschichtchromatographische Technik

Die Chromatogramme wurden bei Raumtemperatur in Glaskammern der Fa. Desaga hergestellt. Vor der eigentlichen Tren-

nung der Jodverbindungen wurde eine Reinigung der Auftragflecke von verbliebenen Lipoidresten mit Chloroform vorgenommen. Dazu wurden die Platten, mit der aufgetragenen Substanz nach oben, in die Glaskammern gestellt. Das aufsteigende Chloroform erreicht nach ca. 30 Minuten die Auftraglinie und verschiebt durch weiteres Aufsteigen die Lipoide von den Extraktflecken bis an die obere Kante der Platte, während die Jodaminosäuren in Chloroform nicht wandern. (Dieses Verfahren wurde an Stelle eines früheren zweidimensionalen Verfahrens entwickelt und besitzt den besonderen Vorteil, daß die verschobenen Lipoide den normalen Verlauf der Trennung der Jodaminosäuren nicht stören.) Nach Abdampfung des Chloroforms wurde die eigentliche Trennung der jodierten phenolischen Aminosäuren in Aceton-0,5 n Essigsäure 2:8 aufsteigend, vorgenommen. In diesem Fließmittel wandern die Lipoide nicht, sondern nur die aufgetragenen Substanzen.

Die Platten wurden über Nacht bei Zimmertemperatur getrocknet und mit FFCA-Reagenz besprüht, unmittelbar photographiert und die Flecke manuell auf Papier durchgepaust (Abb.I).

Farbreagenz

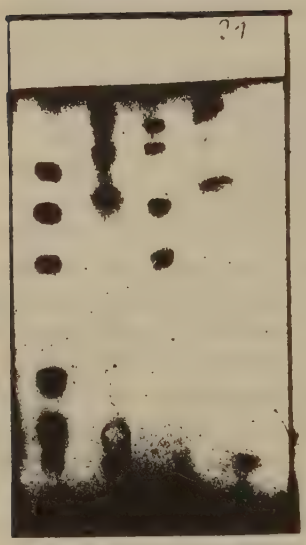
Als Entwicklungsmittel wurde ausschließlich Ferri-Ferricyanid-Arsenige Säure (FFCA) Reagenz nach Gmelin und Virtanen verwendet (26). Unmittelbar vor dem Besprühen wurden die Lösungen A, B und C im Verhältnis 5:5:1 gemischt.

Lösung A: 2,7 g $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ in 100 ml 2 N HCl

Lösung B: 3,5 g $K_3Fe(CN)_6$ in 100 ml dest. Wasser

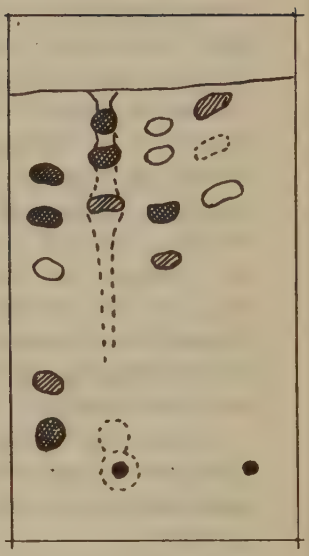
Lösung C: 5 g AsO_2Na in 30 ml 1 N NaOH und mit 65 ml 2 N HCl unter Rühren bei 0° versetzt.

Die Lösungen wurden in Dunkelheit aufbewahrt. Bei Anwendung dieses Reagenzes kann man auf der DC-Platte bis 0,05-0,01 g der hier geprüften Aminosäuren nachweisen (27).



I II III IV

Abb. I



I II III IV

Abb. II

ABBILDUNG I: Aufnahme einer mit FFCA entwickelten DC Platte

I: Standard 1 (von oben nach unten MIT, DIT, T_2, T_3, T_4)
II: Extrakt des Ausgangsserums (in diesem Fall von oben nach unten Jodid, Tyr, Thy, DIT, T_4)
III: Standard 2 (von oben nach unten Tyr, Thy, DIT, T_2)
IV: Extrakt des Serums nach Gabe von TSH (in diesem Fall von oben nach unten Tyr, Thy, DIT)

ABBILDUNG II: DC Platte der Abb. I manuell durchgepaust.

E R G E B N I S S E

I. VORVERSUCHE

Einfluß des Zusatzes von Gips zu Cellulose auf die Wanderungsgeschwindigkeit der Tyrosine, Thyronine und Jodderivate beider Substanzen.

Bei diesen Untersuchungen wurden Celluloseschichten von ca. 0,5 mm Durchmesser mit und ohne Gipszusatz (MN 300 G und MN 300) verwendet. Als Fließmittel diente Aceton-0,5 N Essigsäure 2:8 (V:V). Die Laufstrecke betrug 16 cm, die Temperatur 20° C. Die Ergebnisse sind in Tabelle II dargestellt.

Substanzen	Cellulose ohne Gips	Cellulose mit Gips
Tyr	0,83	0,90
MIT	0,72	0,79
DIT	0,56	0,67
Thy	0,78	0,85
T_1	0,56	0,69
T_2	0,40	0,56
T_3	0,13	0,25
T_4	0,10	0,12

TABELLE II: DURCHSCHNITTLICHE R_F-WERTE VON JE 25 PROBEN JEDER SUBSTANZ

Bei beiden Schichten waren die Flecken auf den Chromatogrammen nach Besprühen mit FFCA-Reagenz deutlich zu erkennen. Überlappungen traten nicht auf. Die Flecke waren gut begrenzt und zeigten keine Schwanzbildung. Bei der MN 300 Schicht trennten sich MIT und DIT etwas besser voneinander als bei der MN 300 G Schicht. T_3 und T_4 dagegen trennten sich bei der MN 300 G Schicht weitaus deutlicher voneinander. Da die Trennung der echten Schilddrüsenhormone T_3 und T_4 von großer praktischer

Bedeutung ist, wurde bei den weiteren Untersuchungen, als stationäre Phase, Cellulose mit Gipszusatz verwendet.

Einfluß der Laufstrecke auf die Trennung der Tyrosine, Thyronine und Jodderivate untereinander.

Bei diesem Versuch wurde Cellulose G als stationäre Phase und Aceton-0,5 N Essigsäure 2:8, als Fließmittel verwendet. Die Laufstrecken betrugen 8 und 16 cm. Die Temperatur war 20°C.

Substanzen	Laufstrecke 16 cm	Laufstrecke 8 cm
Tyr	0,90	0,93
MIT	0,79	0,82
DIT	0,67	0,69
Thy	0,85	0,87
T_1	0,69	0,71
T_2	0,56	0,58
T_3	0,25	0,26
T_4	0,12	0,12

TABELLE III: DURCHSCHNITTLICHE R_F-WERTE VON JE 25 PROBEN JEDER SUBSTANZ BEI 8 UND 16 CM LAUFSTRECKE.

Wie aus der Tabelle III zu ersehen ist, waren die R_F-Werte bei 8 und 16 cm Laufstrecke beinahe gleich. Da die Abstände der Substanzen untereinander bei der kürzeren Laufstrecke jedoch geringer waren, traten teilweise Überlappungen auf. Aus diesem Grunde wurden die weiteren Untersuchungen mit einer Laufstrecke von 16 cm durchgeführt.

Einfluß der Temperatur auf die Wanderungsgeschwindigkeit der Tyrosine, Thyronine und Jodderivate beider Substanzen.

Um den Einfluß der Temperatur auf das System Cellulose G/ Aceton-0,5 N Essigsäure 2:8 zu untersuchen, wurden Trennungen bei 0°, 20° und 50° C vorgenommen. Die Laufstrecke betrug 16 cm.

Die Ergebnisse sind aus Tabelle IV ersichtlich.

Substanzen	0° C	20° C	50° C
Tyr	0,86	0,90	?
MIT	0,75	0,79	?
DIT	0,62	0,67	?
Thy	0,81	0,85	?
T_1	0,63	0,69	?
T_2	0,48	0,56	?
T_3	0,17	0,25	?
T_4	0,07	0,12	?

TABELLE IV: DURCHSCHNITTLICHE R_F-WERTE VON JE 25 PROBEN JEDER SUBSTANZ BEI TEMPERATUREN VON 0°, 20° UND 50° C.*

Bei Erniedrigung der Temperatur auf 0° C waren die R_F-Werte geringer als bei Zimmertemperatur. Dazu war die Laufzeit für dieselbe Laufstrecke größer.

Bei dem Versuch durch Erhöhung der Temperatur auf 50° C noch deutlichere Trennungen zu erhalten, ergaben sich Chromatogramme, bei denen die Thyronine nur undeutlich und verschwommen zu erkennen waren, während die Tyrosine überhaupt nicht sichtbar wurden. Die Ursache hierfür könnte in der Veränderung des Fließmittels nach längerem Einwirken von höheren Temperaturen zu suchen sein. Vielleicht veränderte aber auch das verdampfende Fließmittel nach einiger Zeit die Celluloseschicht derartig, daß die Substanzen nicht mehr in gewohnter Weise aufsteigen konnten.

Aus diesen Versuchen ergab sich schließlich das schon unter Material und Methoden beschriebene dünnschichtchromatographische System.

*Da die Standardabweichungen unter einem Hundertstel der Durchschnittswerte lagen, wurden sie nicht in die Tabelle eingetragen.

II. HAUPTVERSUCHE

Ergebnisse bei einem Kollektiv von normalen Probanden:

Die Chromatogramme zeigten vorwiegend gut sichtbare, regelmäßig begrenzte Flecken, die deutlich voneinander getrennt waren. Farbunterschiede zwischen den verschiedenen Substanzen bestanden nicht. Das läßt erkennen, daß die Reaktion bei allen erhaltenen Chromatogrammen einheitlich war. Erst dadurch, daß die Flecken durch eine stets gleich ablaufende Reaktion entstanden sind, ist ein Vergleich untereinander möglich. Das Auftauchen von Schwanzbildungen wurde in ca. 30% der Fälle beobachtet. Die Wanderungsgeschwindigkeiten der unbekannten Substanzen ergaben, im Verhältnis zur Laufgeschwindigkeit des Fließmittels, R_F-Werte, die in überwiegendem Maße mit den R_F-Werten der Standardsubstanzen übereinstimmten. Es sei jedoch erwähnt, daß die Größe der Auftragflecken einen Einfluß auf die Wanderungsgeschwindigkeit hat. So laufen die Substanzen, die hohe R_F-Werte haben und aus größeren Auftragflecken stammen, etwas weiter, als die entsprechenden Substanzen, die aus punktförmigen Auftragflecken wandern. Substanzen mit niedrigen R_F-Werten, die aus großen Auftragflecken stammen, laufen dagegen etwas weniger weit, als die entsprechenden Substanzen aus punktförmigen Auftragflecken (28). Diese Tatsache wurde bei der Identifizierung der unbekannten Substanzen in dieser Untersuchung stets berücksichtigt, weil der Durchmesser der Auftragflecken der Serumextrakte größer war, als der Durchmesser der Auftragflecken der Standardmischungen.

Tabelle V zeigt die auf den Chromatogrammen nachgewiesenen Substanzen, die an Hand ihrer R_F-Werte im Vergleich zu den Kontrollsubstanzen klassifiziert wurden.

Änderungen der Chromatogramme nach Gabe von Thyreotropin

Bei der Bewertung der im Spektrum der zirkulierenden Jodphenole durch TSH hervorgerufenen Veränderungen wurden an erster Stelle Änderungen in der Anzahl der Flecken im Vergleich zu den entsprechenden Ausgangschromatogrammen berücksichtigt. So wurde eine erste Gruppe aussortiert, bei der die auf den Ausgangschromatogrammen vorhanden gewesenen Flecken auch nach TSH-

NACHGEWIESENE SUBSTANZEN	ABSOLUTER ANTEIL	PROZENTUALER ANTEIL	
			FLIEßMITTEL-FRONT
Jodid	7	28	
U_1	8	32	
Tyr	20	80	
Thy	13	52	
MIT	16	64	
DIT	25	100	
U_2	3	12	
Schw.	8	32	
T_4	19	76	
			AUFTRAGLINIE

TABELLE V: NACHGEWIESENE SUBSTANZEN DES NORMALEN KOLLEKTIVS (25 CHROMATOGRAMME)

Die Substanzen wurden ihren R_F-Werten entsprechend in der Tabelle dargestellt. Ihre Positionen auf der Tabelle wurden auf zwei angegebene Linien (Auftraglinie und Fließmittelfront) bezogen. Außer den gebräuchlichen Abkürzungen für Thyronin, Tyrosin und deren Jodderivate wurden zwei andere Abkürzungen, U_1 und U_2 eingeführt. U_1 stellt eine nach ihrem R_F-Wert nicht identifizierte Substanz dar, die zwischen Jodid und Tyrosin auftaucht. Bei U_2 handelt es sich um eine zweite nicht identifizierte Substanz, die unter DIT erscheint. Die Position der auftretenden Schwanzbildungen wurde durch die Lage der Abkürzung (Schw.) gekennzeichnet.

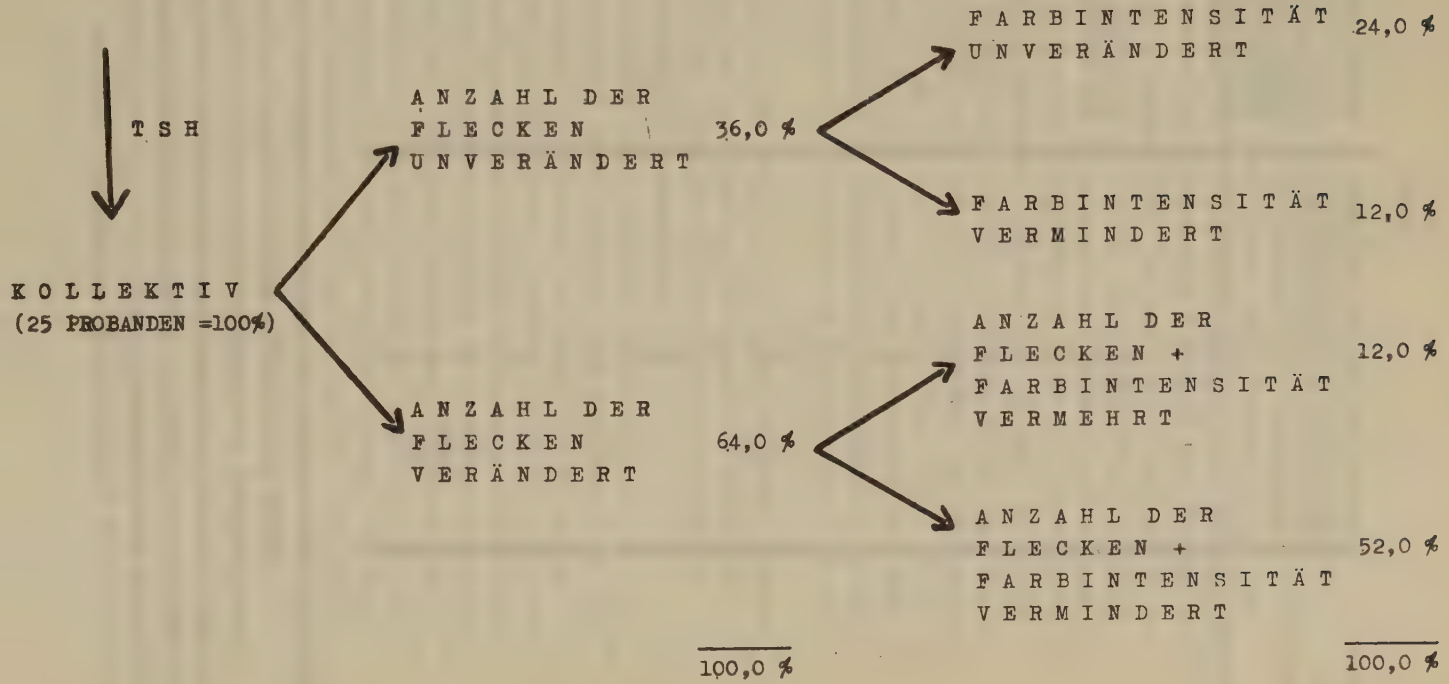
Gabe unverändert auftauchten (36% der Probanden). Die Chromatogramme mit veränderter Anzahl von Flecken (64%) wurden je nach dem vermehrten oder verminderten Auftreten von Substanzen in 2 Untergruppen eingeordnet. Diese Einteilung wurde durch eine quantitative Aussage ergänzt, die an Hand der Intensität der auftretenden Flecken, im Vergleich zu den Ausgangschromatogrammen, getroffen wurde. Hierbei ergaben sich 4 Gruppen von Chromatogrammen (siehe Abbildung III).

a) Eine Gruppe (24%), die im Vergleich zu den Ausgangschromatogrammen die selben Flecken zeigte, die außerdem in der Farbintensität unverändert waren.
b) Eine Gruppe (12%), bei der nach TSH die selben Flecken auftauchten, die hier aber im Vergleich zu den Ausgangschromatogrammen von schwächerer Farbintensität waren.
c) Eine Gruppe (12%), bei der die Anzahl der Flecken und die Farbintensität nach TSH-Gabe vermehrt war.
d) Eine Gruppe (52%), bei der die Anzahl der Flecken und die Farbintensität abgenommen hatte.

Die qualitativen und quantitativen Änderungen jedes Chromatogramms sind aus Tabelle VI ersichtlich.

Es sei erwähnt, daß in keinem Fall nach TSH-Gabe das Auftauchen von neuen Flecken, bei gleichzeitigem Verschwinden von anderen Flecken, die auf den Ausgangschromatogrammen vorhanden waren, beobachtet wurde.

A B B I L D U N G III: BESCHRIEBENE VERÄNDERUNGEN DER CHROMATOGRAMME NACH GABE VON TSH. (Die Prozente der erhaltenen Gruppen wurden auf die Kollektivzahl von 25 bezogen.)



NUMMER DER CHROMATOGR.	ANZAHL DER FLECKEN UNVERÄND.		ANZAHL DER FLECKEN VERÄN	
	FARBINTENSITÄT DER FLECKEN UNVERÄNDERT	FARBINTENSITÄT DER FLECKEN ABGESCHWÄCHT	ANZAHL DER FLECKEN VERMEHRT U. FARBINTENSITÄT VERSTÄRKT	ANZAHL DER FLECKEN VE MINDERT U. I INTENSITÄT GESCHWÄCHT
1				1(-MIT)
2				2(-Ty., $-U_2$,
3	3			
4			4($+T_4$,+MIT)	
5		5		
6		6		
7	7			
8				8($-T_4$)
9				9($-U_2$)
10				10(-MIT)
11			11($+T_4$)	
12				12($-T_4$)
13				13($-T_4$)
14	14			
15				15($-U_2$)
16		16		
17			17($+U_2$)	
18				18($-T_4$)
19				19($-T_4$)
20				20($-T_4$)
21				21($-T_4$,-MIT)
22				22($-T_4$)
23	23			
24	24			
25	25			

TABELLE VI: VERÄNDERUNGEN DER 25 CHROMATOGRAMME NACH GABE VON THYREOTROPIN TABELLARISCH DARGESTELLT.

Die in Klammern stehenden Substanzen sind mit einem + Zeichen versehen, wenn sie erst nach Gabe von TSH auftraten. Sie sind mit einem - Zeichen versehen, wenn sie im Ausgangsspektrum vorhanden waren, nach Gabe von TSH aber fehlten.

U_1 und U_2= nicht identifizierte Substanzen, siehe Tab. V.

D I S K U S S I O N

Die Ergebnisse der Untersuchung des normalen Kollektivs zeigen, daß Thyroxin in 76% der Fälle chemisch darstellbar ist. Trijod-Thyronin und weniger jodierte Thyronine sind bei keinem der Chromatogramme nachweisbar. Von der Gruppe der Jodtyrosine erscheint Dijod-Tyrosin auf allen Chromatogrammen und Monojod-Tyrosin wird in 64% der Fälle gefunden. Tyrosin und Thyronin als nicht jodierte Verbindungen kommen in 80 bzw. 52% der Fälle vor. Diese beiden Aminosäuren spielen zwar im Schilddrüsenparenchym bei der Hormonsynthese eine wichtige Rolle, im Blut dagegen ist ihre Anwesenheit für den Stoffwechsel der halogenierten Substanzen nur von geringer Bedeutung. Ihre Identifizierung ist in dieser Arbeit jedoch wichtig, um Fehlinterpretationen auszuschließen, da sie ein ähnliches chromatographisches Verhalten haben wie einige Jodphenole und außerdem FFCA positiv sind.

Die hier gefundenen Ergebnisse stimmen mit denen anderer Autoren, die mit der gleichen Methode gearbeitet haben, ungefähr überein (29-30). Geringe Abweichungen sind auf kleine methodische Änderungen zurückzuführen.

Der ständige chemische Nachweis von Jodtyrosinen auf den Chromatogrammen, ließe sich durch die hohe Konzentration, in der diese Substanzen zirkulieren, erklären. Für die gerade in diesem Punkt bestehenden starken Abweichungen zu den mit isotopischen Techniken erhaltenen Ergebnissen, wurde bereits eine Erklärung gefunden: Jodtyrosine können mit Radiojod kaum markiert werden und sind daher mit isotopischen Methoden fast gar nicht darstellbar. Thyroxin dagegen ist wegen seiner hohen metabolischen Aktivität isotopisch darstellbar, obgleich es in geringerer Konzentration zirkuliert als Dijod-Tyrosin. Das wiederum ist der Grund, warum Thyroxin bei der chemischen Methode nicht ständig nachweisbar ist.(31).

Eine eingehende Diskussion über mögliche methodische Fehlerquellen und Artefaktbildungen bei der hier angewandten chemischen Nachweismethode wurde von Zappi und Hoppe durchgeführt (32). Dabei wurde durch vergleichende Untersuchungen festge-

stellt, daß die Bildung von Artefakten im Laufe der Extraktion und während des chromatographischen Verfahrens nur in sehr geringem Maße auftritt. Aus diesem Grunde kann auch in dieser Arbeit das Entstehen von Artefaktbildungen so gut wie ausgeschlossen werden, so daß die hier identifizierten Substanzen als tatsächlich vorhanden angesehen werden können.

Über die Bedeutung der beim Kollektiv der normalen Probanden in 12% der Fälle auftretenden nicht identifizierten Substanzen kann keine Aussage gemacht werden, weil nicht nur ihre Struktur unbekannt ist, sondern es außerdem ungeklärt bleibt, ob es sich überhaupt um jodierte Substanzen handelt. Die Spezifität des FFCA-Reagenzes für Jodverbindungen ist bekanntlich nicht hoch und daher ist eine Identifizierung nur durch den Vergleich mit Standardsubstanzen möglich (33).

Bei der Diskussion der Änderungen der Spektren der Jodverbindungen nach Gabe von Thyreotropin sei zuerst darauf hingewiesen, daß das zweite Chromatogramm jedes Patienten mit derselben Menge Serum, wie das Ausgangschromatogramm angefertigt wurde. Durch Verwendung der gleichen Serummenge wird es erst möglich, die beobachteten Veränderungen, direkt auf quantitative Änderungen der zirkulierenden Substanzen zu beziehen.

Aus dem Vergleich der Ausgangsspektren mit den Spektren nach Gabe von Thyreotropin ersieht man, daß die chromatographischen Änderungen keineswegs einheitlich sind. Um die verschiedenen Antworten auf den Chromatogrammen bewerten zu können, wurde eine Unterteilung nach qualitativen und quantitativen Gesichtspunkten vorgenommen. So ergab sich eine große Gruppe (52%), bei der Anzahl und Farbintensität der Flecken nach Gabe von Thyreotropin abgenommen hatte. Die zahlenmäßige Verminderung der Flecken wurde hauptsächlich durch das Verschwinden von Thyroxin und in geringerem Maße von Monojod-Tyrosin hervorgerufen. Dijod-Tyrosin dagegen erschien sowohl vor wie nach Gabe von Thyreotropin auf allen Chromatogrammen. Die quantitative Verminderung der Substanzen war aus der allgemeinen Abschwächung der Farbintensität aller Flecken ersichtlich. Eine zweite kleinere Gruppe (12%) setzte sich aus Chromatogrammen zusammen, bei denen die Anzahl der nachweisbaren

Substanzen unverändert geblieben war, bei der die Farbintensität aller Flecken jedoch abgenommen hatte. Eine dritte Gruppe (24%) enthielt Chromatogramme, die nach Thyreotropin völlig unverändert geblieben waren. Schließlich ergab sich eine vierte Gruppe (12%), die aus Chromatogrammen bestand, die nach der Stimulation der Schilddrüse eine Vermehrung der Flecken zeigte. Zusammenfassend kann man sagen, daß die Verminderung der Substanzen nach Gabe von Thyreotropin im Vordergrund steht. Diese Tatsache ist auffällig, da Thyreotropin bekanntlich eine vermehrte Ausschüttung von jodierten Substanzen aus der Schilddrüse hervorruft (34). Die hier festgestellte Verminderung der Substanzen könnte durch die erhöhte Metabolisierung der Hormone in der Peripherie erklärt werden. Unterschiede zu anderen bisher gemachten Untersuchungen über die Thyreotropinwirkung können darauf zurückzuführen sein, daß diese Untersuchungen fast ausschließlich mit Radiojod durchgeführt wurden, was, wie oben schon erwähnt, zu verschiedenen Ergebnissen im Vergleich zu chemischen Methoden führt.

Die auf den Chromatogrammen festgestellte Verminderung von Thyroxin weist auf einen schnelleren Abbau der Substanz nach Gabe von Thyreotropin hin. Dieser schnelle Abbau scheint durch die Herabsetzung der Bindungsfähigkeit der Hormonträger der Präalbumine und der Inter-α-Fraktion durch Thyreotropin bedingt zu sein (35). Die Tatsache, daß Dijod-Tyrosin in allen Fällen im Blut unverändert bleibt, deutet auf die physiologische Inaktivität dieser Substanz hin, die auch durch Thyreotropin unbeeinflußt bleibt. Einen weiteren Hinweis für diese Annahme findet man in der Tatsache, daß Dijod-Tyrosin mit Radiojod kaum markiert werden kann. Das chromatographische Verhalten von Monojod-Tyrosin nach Thyreotropin könnte auf eine erhöhte physiologische Aktivität im Vergleich zu Dijod-Tyrosin hinweisen. Die Veränderungen von Tyrosin und Thyronin werden aus oben erwähnten Gründen hier nicht weiter diskutiert.

Daß die überwiegende Zahl der Probanden auf Gabe von Thyreotropin mit einer Verminderung der zirkulierenden Jodaminosäuren reagiert, deutet auf eine gemeinsame Tendenz des Kollektivs hin. Die Erklärung dafür, daß 24% der Chromatogramme unverändert blieben, könnte in der für einige Patienten unzurei-

chenden Thyreotropindosis liegen. Es sei hier erwähnt, daß gerade diese 24% der Probanden nach Thyreotropin keine klinischen Reaktionen zeigten (siehe Tab. VII). Die Tatsache, daß bei 12% der Patienten eine Vermehrung der Flecken auf den Chromatogrammen auftritt, ist auf die unterschiedlichen Reaktionen der Organismen auf Gabe von Thyreotropin zurückzuführen. Zwar reagieren die Schilddrüsen euthyreoter Patienten auf die Stimulation durch Thyreotropin einheitlich, aber das weitere Schicksal der sezernierten Substanzen in der Peripherie ist unbestimmt und keineswegs gleich. Daher ist es verständlich, daß nach gleich starker Stimulation der Schilddrüse bei den einzelnen Probanden unterschiedliche Antworten auftreten können.

Z U S A M M E N F A S S U N G

Es wurden die Veränderungen, die durch Thyreotropingabe im menschlichen Spektrum der zirkulierenden Jodphenole hervorgerufen werden, mittels dünnschichtchromatographischer Techniken untersucht.

Die mit chemischen Jodnachweisreagentien entwickelten Chromatogramme zeigten als allgemeine Tendenz eine Verminderung der Anzahl der Flecken im Vergleich zu den Ausgangschromatogrammen. Diese beobachtete Verminderung wurde hauptsächlich durch das Verschwinden von Thyroxin hervorgerufen. Dijodtyrosin erschien auf allen Ausgangschromatogrammen und blieb nach TSH-Gabe stets unverändert. Außerdem wurde bei der Mehrzahl der Chromatogramme nach TSH-Gabe eine Abschwächung der Farbintensität der Flecken beobachtet.

Es wurde versucht, Erklärungen für die hier beobachteten Reaktionen zu finden und Rückschlüsse auf die physiologische Rolle von Thyroxin und Dijodtyrosin an Hand ihres Verhaltens nach Gabe von Thyreotropin zu ziehen.

L I T E R A T U R

1) D'Angelo S.A.
Role of the hypothalamus in pituitary thyroid interplay
J. Endocrinology, 17, 286, (1958)

2) Oberdisse K. und Klein E.
Die Krankheiten der Schilddrüse
Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1967), Seite 96

3) Randall Raymond V., Albert A.
The Effect of Hypophysectomy on the Uptake of Radioactive Iodine by the Thyroid of the Rat.
Endocrinology, 48, 327, (1951)

4) Einhorn J., Larsson L.-G.
Studies on the Effect of Thyrotropin on Human Thyroid Function.
J. Clin. Endocr. 19, 28 (1959)

5) Welby M.L., Hetzel B.S.
Demonstration of Iodotyrosines in Human Plasma in Response to Thyroid Stimulation.
Nature (London) 193, 752, (1962)

6) Block R.V., Werner S.C., Mandl R.H., Row V., Radichewich I.
The Probable Presence of Diiodotyrosine and of Monoiodotyrosine in human serum. A Discrepancy between the Distribution of Iodo Compounds when Estimated by I^{131} and I^{127}.
Arch. Biochem. Biophys. 88, 98, (1960)

7) Werner S.C., Radichewich I.
Presence of Iodine-127 Iodotyrosines in Extracts of Normal Human Serum.
Nature (London) 197, 887, (1963)

8) Wiener J.D.
Functional Heterogencity of the Thyroid and Possible Presence of Iodotyrosine. Like Compounds in Normal Serum.
Acta endocr., K'hvn 48, 199, (1965)

9) Weinert H., Masui H,, Radichewich I., Werner S.C.
Material Indistinquishable from Iodotyrosines in Normal Human Serum and Human Serum Albumin.
J.Clin.Invest. 46, 1264, (1967)

10) Werner S.C., Block R.J.
Discrepancy between the Distribution of Iodine in Human Serum when Estimated by Iodine-131 and Iodine-127.
Nature (London) 183, 406, (1959)

11) Roche J., Michel R., Michel O., Lissitzky S.
Sur la Déshalogénation Enzymatique des Iodotyrosines par le Corp Thyroide et sur son Role Physiologique
Biochim.biophysica Acta (Amsterdam) 9, 161, (1952)

12) Dingledine
J.Clin. Endocr. 15, 724, (1955)

13) Beale D., Whitehead J.K.
A Preliminary Investigation of the Levels of 3-Monoiodotyrosine and 3,5-Diiodotyrosine in Human Blood Plasma using Isotope Dilution Technique.
Clin.chim.Acta (Amsterdam) 5, 150, (1960)

14) Dimitriadou A., Manipol V., Fraser R.
Further Studies on the Nature of the Iodotyrosines Demonstrable in Normal Human Serum.
Biochem.J. 82, 20P, (1962)

15) Dimitriadou A., Turner P.C.R., Slater J.D.H., Fraser R.
Iodotyrosine-like Material in Serum Detected by Analysis for ^{127}I but not ^{131}I.
Biochem.J. 82, 20P, (1962)

16) Dimitriadou A., Fraser R., Turner P.C.R.
Iodotyrosine-like Substances in Human Serum
Nature (London) 201, 575, (1964)

17) Rhodes B.A., Wagner jun. H.N.
Are Iodotyrosines Normal Constituents of Plasma?
Nature (London) 210, 647, (1966)

18) Shalom E.S.
Iodinated Constituents of Plasma of Normal Subjects and of Patients Suffering from Thyrotoxicosis
J.Endocrinology, 36, 1, (1966)

19) Földes J., Gyertyánfy G., Tamas G., Gesztesi E., Takacs J.
Der Plasma-Jodtyrosingehalt bei Euthyreose und Basedowscher Krankheit.
Nucl. Med. (Stuttgart), 6, 400, (1967)

20) Acland D.J.
A possible source of artifacts in the chromatography of tissue extracts containing inorganic iodide.
Nature (London), 170, 32, (1952)

21) Hoppe G., Zappi E., Gries G.
Ein neues kombiniertes Verfahren zur Analyse von Schilddrüsenhormonen und deren Metaboliten im Serum.
Nucl.Med. (Stuttgart), 6, 44, (1967)

22) Zappi E., Hoppe G.
Verhalten organischer und anorganischer ^{131}I Jodverbindungen im Laufe einer Serumextraktion von Schilddrüsenhormonen.
Nucl.Med. (Stuttgart), 6, 420, (1967)

23) Hollingsworth D.K., Dillard M., Bondy P.K.
Separation of Iodoamino Acids and Related Compounds by Thyn-Layer Chromatography.
J.Lab.&Clin.Med., 62, 346, (1963)

24) Gries G., Pfeffer K.H., Zappi E.
Eine Methode der dünnschichtchromatographischen Trennung von schilddrüsenaktiven Jodaminosäuren.
Klin.Wschr., 43, 515, (1965)

25) Zappi E.
Dünnschichtchromatographisches Verhalten verschiedener jodierter Aminosäuren von biologischer Bedeutung
Inaugural-Dissertation, Freie Universität Berlin (1967)

26) Gmelin R., Virtanen A.
A Sensitive Colour Reaction for the Paperchromatographic Detection of Iodide, Iodinated Tyrosines and Thyronines.
Acta.chem.scand., 13, 1469, (1959)

27) Zappi E.
Application of the FFCA-Reaction for the Detection of Thyroid Hormones and Iodinated Derivatives to Thin-Layer Chromatography.
J.Chromatogr., 31, 241, (1967)

28) Zappi E.
Unveröffentliche Untersuchung

29) Zappi E., Hoppe G., Schmidt M., Prange F.
z.Klin. Chemie, zur Veröffentlichung

30) Schmidt M.
Dünnschichtchromatographische Untersuchungen jodierter phenolischer Aminosäuren im Serum.
Inaugural-Dissertation, Freie Universität Berlin (1969)

31) Zappi E., Hoppe G.
Serumextraktion und dünnschichtchromatographische Trennung zirkulierender Jodaminosäuren.
Z.klin. Chemie, 5, 209, (1967)

32) Zappi E., Hoppe G.
Qualitative Änderungen verschiedener jodierter phenolischer Aminosäuren im Laufe einer alkoholischen Extraktion aus wässrigen Lösungen.
Z.Klin.Chemie, 6, 105, (1968)

33) Zappi E.
Characteristics of the reactivity of thyronine, tyrosine and some iodinated derivates of these substances in the presence of the ferricferricyanide-arsenious acid reagent.
Zur Veröffentlichung

34) Dingledine W.S., Egdahl R.H.
Studies on Human Thyroid Venous Blood-TSH Response
Metabolism 16, 1042, (1967)

35) Scazziga B.-R., Lemarchand-Béraud Th.
Die Pathophysiologie der Schilddrüse
Acta clinica, Documenta geigy (1966), Seite 14.

L E B E N S L A U F

Am 10. Mai 1944 wurde ich, Fred Rainer P r a n g e , als Sohn des Zahnarztes Willi Prange und seiner Ehefrau Johanna Prange, geb. Bade, in Treuburg, Ostpreußen, geboren. Dort wurde ich am 18. 6. 1944 evangelisch getauft.

Vom 1. September 1950 bis zum 28. März 1956 besuchte ich die 5. Grundschule in Berlin-Wilmersdorf. Im April 1956 wechselte ich zur Walther-Rathenau-Schule in Berlin-Grunewald über, wo ich im Februar 1963 die Reifeprüfung bestand.

Am 15. Juni 1963 wurde ich an der Freien Universität Berlin als Student der Human-Medizin immatrikuliert. Hier legte ich am 21. April 1964 die naturwissenschaftliche Vorprüfung und am 14. März 1966 die ärztliche Vorprüfung ab.

Am 26. August 1969 beendete ich das Studium der Human-Medizin an der Freien Universität Berlin mit bestandenem Staatsexamen.